

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

REC'D 11 FEB 2004	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 58 117.7

**Anmeldetag:** 6. Dezember 2002

**Anmelder/Inhaber:** Technische Universität Dresden Klinik für Urologie,  
01307 Dresden/DE

**Bezeichnung:** Gegen hTERT gerichtete Erkennungsmoleküle  
und die Verwendung dieser

**IPC:** A 61 K 48/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der  
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. Januar 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Wallner

**BEST AVAILABLE COPY**

ANWALTSKANZLEI  
**Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider**  
Patente Marken Design Lizenzen

Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

**Patentanwälte**  
**European Patent and Trademark Attorneys\***

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.\*  
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.<sup>3</sup>\*  
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.<sup>2</sup>\*  
Henry Schneider, Dipl.-Ing.\*  
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.<sup>1</sup>\*  
Dieter K. Wicht, Dipl.-Ing.<sup>1</sup>\*  
Isolde U. Winkler, Dipl.-Ing.\*  
Dorit Rasch, Dipl.-Chem.\*  
Dr. Sven Lange, Dipl.-Biologe<sup>2</sup>  
Stephan Mainitz, Dipl.-Chem.

**Rechtsanwalt**

Jörg K. Grzam  
Marco Scheffler

Schützenstraße 15-17  
D-10117 Berlin-Mitte

Tel.: 030/206 23-0 / 030/264 13 30  
Fax: 030/206 23-127

[office@berlin-patent.net](mailto:office@berlin-patent.net)  
[www.berlin-patent.net](http://www.berlin-patent.net)

Unser Zeich./our reference  
P174702DE-LA

Datum/date  
Berlin, 6. Dezember 2002

**Anmelder:**

Technische Universität Dresden  
Klinik für Urologie  
Fetscherstraße 74

01307 Dresden

---

~~Gegen hTERT gerichtete Erkennungsmoleküle und die~~  
~~Verwendung dieser~~

---

---

<sup>1</sup> **Büro Berlin-Adlershof**  
Rudower Chaussee 29  
D-12489 Berlin  
Tel.: 030/6392 31 95  
Fax: 030/6392 31 99

<sup>2</sup> **Büro Berlin-Buch**  
Robert-Rössle-Straße 10  
D-13125 Berlin  
Tel.: 030/9489 21 70  
Fax: 030/9489 21 72

<sup>3</sup> **Büro München**  
Sendlinger Straße 2  
D-80331 München  
Tel.: 089/2323 61 82  
Fax: 089/2323 61 83

5

---

Gegen hTERT gerichtete Erkennungsmoleküle und die  
Verwendung dieser

---

10

Beschreibung

15

Die vorliegende Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) gerichtet sind sowie die Verwendung dieser Erkennungsmoleküle zur Diagnose, Prophylaxe, Verminderung, Verlaufskontrolle von mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten, wie beispielsweise Tumorerkrankungen.

25

Es ist bekannt, dass die Replikation der Enden von eukaryotischen Chromosomen spezialisierte Zellbestandteile erfordert. Die Replikation eines linearen DNA-Stranges erfolgt in der Regel in 5'-3'-Richtung. Bei Entfernung der an das äußere 3'-Ende chromosomaler eukaryotischer DNA-Stränge gebundener Primer und beteiligten Enzyme, die für die Replikation mitverantwortlich sind, wird eine Lücke eingeführt, wodurch es zu einer fortschreitenden Verkürzung

30

der Tochterstränge bei jeder Replikation kommt. Diese Verkürzung an den Enden der Chromosomen ist unter anderem für die Alterung von Zellen verantwortlich. Die Struktur dieser Enden, die auch als Telomere bezeichnet werden, ist

5 in zahlreichen lebenden Systemen untersucht. Übereinstimmend mit der Beziehung zwischen Telomeren und der Telomerase sowie der Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde eine Telomeraseaktivität in

10 immortalisierten/unsterblichen Zelllinien und in unterschiedlichen Arten von Tumorgeweben nachgewiesen. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen dem Level der Telomeraseaktivität in einem Tumor und dem klinischen Verlauf der Tumorerkrankung bekannt. Daher ist die

15 menschliche Telomerase ein ideales Ziel für die Diagnose und Behandlung menschlicher Krankheiten, die sich auf die zelluläre Proliferation, wie beispielsweise Krebs, beziehen. Verfahren zur Diagnose und Behandlung von Krebs und anderen mit der Telomerase in Zusammenhang stehenden Krankheiten sind unter anderem offenbart in der

20 US 5 489 508 oder US 5 645 986. Die Hemmung der Telomerase wurde als spezifische Möglichkeit zur therapeutischen Kontrolle von Tumorzellen beschrieben. Wichtige Bemühungen, die Aktivität der Telomerase im Zusammenhang von Krebserkrankungen zu modifizieren, sind in der EP 666313,

25 WO 97/37691 oder der WO 98/28442 offenbart. Derartige Lehren offenbaren dem Fachmann aber keine konkreten Lehren zum technischen Handeln. Eine Substanz bzw. ein Molekül, das mit dem gesamten Bereich einer Telomerase wechselwirkt,

---

30 - beispielsweise in einer Zellkultur - reduziert wird, derartige Substanzen eignen sich aber nicht zur Applikation

in Organismen, da sie in der Regel viel zu groß sind und vom Immunsystem des betreffenden Organismus angegriffen und zerstört werden. Aufgabe der Erfindung war es daher, alternative kompakte Moleküle bereitzustellen, die mit  
5 ausgewählten, spezifischen Struktureinheiten, die die Telomerase kodieren, einfach und effektiv inhibierend wechselwirken.

Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die  
10 Bereitstellung eines Erkennungsmoleküls, das gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase gerichtet ist, wobei das Erkennungsmolekül insbesondere mit Primärstrukturen der katalytischen Untereinheit der humanen  
15 Telomerase-mRNA in einem Target-Sequenzbereich von 2000 bis 2500 gemäß der Genbank Accession number 015950 spezifisch interagiert. Die Erfindung betrifft also die überraschende Lehre, dass gegen tumorassoziierte abnorme hTERT-mRNA-Expressionsmuster sowie Telomeraseaktivitätsniveaus durch  
20 eine mögliche hTERT-Inhibition mit den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen vorgegangen werden kann. Diese Erkennungsmoleküle sind gegen definierte mRNA-Sequenzmotive im Bereich von 2000 bis 2500 gerichtet. Sie können biologische und/oder chemische Strukturen sein, die in der Lage sind, so mit dem Target-Sequenzbereich zu  
25 interagieren, dass eine Wechselwirkung bestimmt werden kann. Beispiele für Erkennungsmoleküle sind insbesondere Nukleinsäurekonstrukte, Lektine oder Antikörper.

---

~~In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung~~  
30 interagiert das Erkennungsmolekül mit einem Target-Sequenzbereich von 2100 bis 2400. Dieser Bereich ist vorteilhaft, um eine hTERT-Inhibition zu erreichen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung interagiert das Erkennungsmolekül mit einem Target-Sequenzbereich von 2190 bis 2360. In diesem Bereich ist mit Vorteil eine besonders gute hTERT-Inhibition erreichbar.

10 In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform interagiert das Erkennungsmolekül spezifisch mit dem Target-Sequenzbereich von 2191 bis 2224 und/oder von 2318 bis 2346. Vorteilhafterweise ist in diesen Sequenzbereichen eine besonders effiziente hTERT-Inhibition möglich.

15 Durch diese bevorzugten Target-Sequenzbereiche ist es dem Fachmann möglich, insbesondere sehr kleine und/oder kompakte Erkennungsmoleküle bereitzustellen, die im Wesentlichen nicht mit anderen Strukturen, insbesondere immunologischen Abwehrstrukturen, innerhalb des Zellgewebes bzw. des Organismus interagieren oder von diesen 20 angegriffen werden, sondern spezifisch mit dem Target-Sequenzbereich der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase-mRNA interagieren können.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Sequenzbereich oder das Erkennungsmolekül durch Addition, Amplifikation, Inversion, Missense-Mutation, Nonsense-Mutation, Punktmutation, Deletion und/oder Substitution modifiziert ist. Diese Modifikationen können beispielsweise beim Erkennungsmolekül 30 dazu führen, dass es mit einer höheren Avidität oder Spezifität an die katalytische Untereinheit bindet. Es kann jedoch selbstverständlich auch vorgesehen sein, dass das Erkennungsmolekül mit geringerer Spezifität oder Avidität

bindet. Bei den Mutationen im Sequenzbereich kann es sich im Sinne der Erfindung zum Beispiel um vererbare oder nicht vererbare Veränderungen handeln. Die Modifikationen können so beschaffen sein, dass sie direkt auf der mRNA-Ebene oder auf der DNA-Ebene detektierbar werden. Zu den Mutationen können beispielsweise auch Mutationen im Zusammenhang mit einer zytologisch sichtbaren Genom- und/oder Chromosomenmutationen zählen, die mit Veränderungen der hTERT assoziiert sind. Derartige Mutationen können dadurch entstehen, dass Teile des Chromosoms verloren gehen, verdoppelt werden, in umgekehrter Orientierung vorliegen oder auf andere Chromosomen übertragen werden. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die Mutation nur ein oder wenige benachbarte Basenpaare betrifft, wie dies beispielsweise bei der Punktmutation der Fall ist. Geht beispielsweise ein Basenpaar in Form einer Deletion verloren oder wird ein Basenpaar zusätzlich, wie bei der Insertion, eingeschoben, so verschiebt sich das Leseraster des betroffenen Gens, insbesondere zu einer Leserastermutation. Bei der Substitutionsmutation im Sinne der Erfindung wird beispielsweise eine Base gegen eine andere ausgetauscht, wobei die daraus resultierenden Konsequenzen unterschiedlich sein können:

25

(a) Es kann beispielsweise ein Kodon in ein synonymes Kodon umgewandelt werden,

30

~~(b) oder die Mutation verändert die Kodonspezifität und~~  
führt damit zum Einbau anderer Aminosäuren bzw.

(c) durch die Mutation wird die Translation an einer bestimmten Stelle beendet, wobei die gebildeten hTERT-Fragmente inaktiv oder aktiv sein können.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Erkennungsmolekül immobilisiert. Im Sinne der Erfindung werden unter Immobilisierung verschiedene Verfahren und Techniken zum Fixieren der Erkennungsmoleküle auf bestimmten Trägern verstanden. Die Immobilisierung kann  
10 beispielsweise der Stabilisierung der Erkennungsmoleküle dienen, wodurch diese insbesondere bei Lagerung oder bei einmaligem Batch-Ansatz durch biologische, chemische oder physikalische Einwirkungen in ihrer Aktivität nicht reduziert oder nachteilig modifiziert werden. Durch die  
15 Immobilisierung der Erkennungsmoleküle ist ein wiederholter Einsatz unter technischen oder klinischen Routine-Bedingungen möglich; weiterhin kann die Probe mit den Erkennungsmolekülen kontinuierlich umgesetzt werden. Dies kann insbesondere durch verschiedene  
20 Immobilisierungstechniken erreicht werden, wobei die Bindung der Erkennungsmoleküle an andere Erkennungsmoleküle oder Moleküle bzw. an einen Träger so erfolgt, dass die dreidimensionale Struktur am aktiven Zentrum der entsprechenden Moleküle, insbesondere der  
25 Erkennungsmoleküle, nicht verändert wird. Vorteilhafterweise geht die Spezifität zu der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase und die Spezifität der eigentlichen Bindungsreaktion durch die Immobilisierung nicht verloren. Im Sinne der Erfindung können drei  
30 grundsätzliche Methoden zur Immobilisierung verwendet werden:



(i) Quervernetzung: Bei der Quervernetzung werden die Erkennungsmoleküle miteinander fixiert, ohne dass ihre Aktivität nachteilig beeinflusst wird. Sie sind vorteilhafterweise durch die Quervernetzung nicht mehr löslich.

(ii) Bindung an einen Träger: Die Bindung an einen Träger erfolgt zum Beispiel durch Adsorption, Ionenbindung oder kovalente Bindung. Dies kann auch innerhalb von mikrobiellen Zellen bzw. Liposomen oder anderen membranhaltigen geschlossenen bzw. offenen Strukturen erfolgen. Das Erkennungsmolekül wird durch die Fixierung vorteilhafterweise nicht in seiner Aktivität beeinflusst. Es kann mit Vorteil zum Beispiel in der Klinik in Diagnose oder Therapie trägergebunden mehrfach oder kontinuierlich eingesetzt werden.

(iii) Einschluss: Der Einschluss erfolgt im Sinne der Erfindung insbesondere an eine semipermeable Membran in Form von Gelen, Fibrillen oder Fasern. Gekapselte Erkennungsmoleküle sind durch eine semipermeable Membran so durch die umgebende Probenlösung getrennt, dass sie vorteilhafterweise noch mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase oder mit Fragmenten dieser interagieren können. Für die Immobilisierung stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, wie beispielsweise die Adsorption an einen inerten oder elektrisch geladenen anorganischen oder organischen Träger. Solche Träger können

beispielsweise poröse Gele, Aluminiumoxid, Betonid, Agarose, Stärke, Nylon oder Polyacrylamid sein. Die Immobilisierung erfolgt hierbei durch physikalische

Bindungskräfte, oft unter Beteiligung von hydrophoben Wechselwirkungen und ionischen Bindungen. Derartige Methoden sind vorteilhafterweise einfach zu handhaben und sie beeinflussen die Konformation der Erkennungsmoleküle nur in geringem Umfang. Durch elektrostatische Bindungskräfte zwischen den geladenen Gruppen der Erkennungsmoleküle und dem Träger kann die Bindung vorteilhafterweise verbessert werden, zum Beispiel durch die Verwendung von Ionenaustauschern, wie zum Beispiel Sephadex. Ein weiteres Verfahren ist die kovalente Bindung an Trägermaterialien. Die Träger können dazu reaktive Gruppen aufweisen, die mit Aminosäure-Seitenketten homöopolare Bindungen eingehen. Geeignete Gruppen in Erkennungsmolekülen sind Carboxy-, Hydroxy- und Sulfidgruppen und insbesondere die endständigen Aminogruppen von Lysinen. Aromatische Gruppen bieten die Möglichkeit für Diazo-Kupplungen. Die Oberfläche von mikroskopischen porösen Glasparkeln kann durch Behandlung mit Silanen aktiviert und anschließend mit Erkennungsmolekülen umgesetzt werden. Hydroxy-Gruppen natürlicher Polymere können zum Beispiel mit Bromcyan aktiviert und anschließend mit Erkennungsmolekülen gekoppelt werden. Mit Polyacrylamid-Harzen können zahlreiche Erkennungsmoleküle vorteilhafterweise direkte kovalente Bindungen eingehen. Bei dem Einschluss in dreidimensionale Netzwerke werden die Erkennungsmoleküle in ionotrophe Gele oder andere dem Fachmann bekannte Strukturen eingeschlossen. Die Poren der Matrix sind insbesondere so beschaffen, dass die Erkennungsmoleküle zurückgehalten werden und eine Interaktion mit den Target-Molekülen möglich ist. Bei der Quervernetzung werden

die Erkennungsmoleküle durch Vernetzung mit bifunktionellen Agenzien in polymere Aggregate umgewandelt. Derartige Strukturen sind gelatinös und leicht verformbar und insbesondere für den Einsatz in verschiedenen Reaktoren geeignet. Durch Zugabe anderer inaktiver Komponenten, wie zum Beispiel Gelatine, bei der Vernetzung können die mechanischen und enzymatischen Eigenschaften vorteilhafterweise verbessert werden. Bei der Mikroverkapselung wird der Reaktionsraum der Erkennungsmoleküle mit Hilfe von Membranen eingegrenzt. Die Mikroverkapselung kann zum Beispiel als Grenzflächen-Polymerisation durchgeführt werden. Durch die Immobilisierung bei der Mikroverkapselung werden die Erkennungsmoleküle unlöslich und dadurch wieder verwendbar. Im Sinne der Erfindung sind immobilisierte Erkennungsmoleküle alle Erkennungsmoleküle, die sich in einem Zustand befinden, der ihre Wiederverwendung erlaubt. Die Einschränkung der Beweglichkeit und der Löslichkeit der Erkennungsmoleküle auf chemischem, biologischem oder physikalischem Wege führt vorteilhafterweise zu niedrigen Verfahrenskosten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Erkennungsmolekül ein Nukleinsäurekonstrukt, ein Chelator, ein Lektin und/oder ein Antikörper. Nukleinsäurekonstrukte im Sinne der Erfindung können alle Strukturen sein, die im Wesentlichen auf Nukleinsäuren basieren oder deren aktives Zentrum im Wesentlichen auf Nukleinsäuren basiert. Es kann selbstverständlich möglich sein, dass das gesamte Konstrukt vor allem aus Lipiden, Kohlenhydraten oder Proteinen bzw. Peptiden besteht - beispielsweise in Form einer

Nanokapsel - und dieses Konstrukt einen Bereich umfasst, der Nukleinsäuren enthält, die mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase wechselwirken können. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, 5 derartige Konstrukte bereitzustellen: Ein Chelator im Sinne der Erfindung ist eine Sammelbezeichnung für zyklische Verbindungen, bei denen Metalle, Gruppierungen mit einsamen Elektronenpaaren oder mit Elektronenlücken und Wasserstoff an der Ringbildung beteiligt sind und die weiterhin in der Lage sind, mit der katalytischen Untereinheit der humanen 10 Telomerase-mRNA spezifisch zu interagieren. Die Koordinationsverbindungen der Metalle, die im Sinne der Erfindung als Metallchelatoren bezeichnet werden können, sind besonders vorteilhaft. Es sind Verbindungen, in denen 15 ein einzelner Ligand mehr als eine Koordinationsstelle an einem Zentralatom besetzt, das heißt mindestens zweizellig ist. In diesem Falle werden normalerweise gestreckte Verbindungen durch Komplexbildung über ein Metallatom oder -ion zu Ringen geschlossen, wobei diese Ringe in der Lage 20 sind, spezifisch mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase-mRNA zu interagieren. Ein Lektin im Sinne der Erfindung ist insbesondere ein Phytohämagglutinin, häufig ein Pflanzenprotein, das aufgrund seiner hohen Affinität zu bestimmten Komponenten 25 an der Oberfläche bestimmter Nukleinsäurestrukturen spezifisch binden und agglutinieren kann. Insbesondere wechselwirken Lektine mit Zuckerstrukturen, die mit spezifischen Sequenzbereichen einer Nukleinsäure assoziiert sein können. Ein Antikörper im Sinne der Erfindung bindet 30 die genannten Targetbereiche der hTERT spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (zum

Beispiel oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Antikörperfragmente, die bestimmte  
 5 Determinanten des Targetbereiches binden. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven Bindung teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

- 10 (1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei  
 15 eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;
- (2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil der  
 20 schweren Kette erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;
- (3) F(ab')<sub>2</sub>, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten  
 25 lässt; F(ab')<sub>2</sub> ist eine Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;

---

- (4) Fv, definiert als gentechnisch verändertes  
 30 Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette

enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

- (5) Einzelketten-Antikörper („SCA“), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff Epitop bedeutet einen bestimmten Targetbereich eines Gens einer katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase, der so ausgebildet ist, dass ein Antikörper in der Lage ist, mit diesem spezifisch zu interagieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäurekonstrukt ein Antisense(AS)-Oligonukleotid, ein DNazym, ein Ribozym, eine siRNA und/oder eine Peptid-Nukleinsäure (PNA).

Bei AS-Konstrukten handelt es sich um synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die eine selektive Inhibition der Biosynthese ausgewählter Proteine ermöglichen. Zum Einsatz kommen zum Beispiel Oligodesoxynukleotide (ODN), Peptid-Nukleinsäuren (PNAs), Ribozyme, DNazyme. Die AS-Wirkung beruht auf der sequenzspezifischen Hybridisierung der Konstrukte durch Watson-Crick-Basenpaarung mit der für das zu reprimierende Protein kodierenden Ziel-mRNA, was über verschiedene Mechanismen zu einer Verhinderung der Proteinsynthese führt (Tab.1).

Tab. 1 AS-Effekte und ihre Wirkungsmechanismen  
ss - "single stranded" (Einzelstrang)

Effekt	Mechanismus	Referenzen
Transkriptionsinhibition	Bindung der AS-Konstrukte an genomische DNA durch Hoogsten-Triplex-Bildung	[Moser et. al.]
Modulation der RNA-Prozessierung	a) Blockierung von Spleißstellen führt zur Verhinderung des Spleißvorgangs b) Verhinderung der Polyadenylierung destabilisiert die mRNA c) Behinderung des mRNA-Transports ins Zytoplasma	[Kole et. al., Crooke]
Hemmung der Translation	kompetitive Bindung des AS-Konstrukts an die Ziel-mRNA verhindert Initiations- bzw. Elongationsprozess	[Boiziau et. al.]
Spaltung der Ziel-mRNA	a) selektiver Abbau des RNA-Stranges in RNA-DNA-Hybriden durch die Endonuklease RNase H b) Abbau von ss-RNA durch die Endonuklease RNase L nach Aktivierung durch 2',5'-Tetraadenylat-modifizierte ODN c) durch Ribozyme/DNAzyme katalysierte, sequenzspezifische Spaltung der Ziel-mRNA	[Crooke, Agrawal et. al., Sun et. al.]

- 5 Die Entwicklung von Antisense-Oligonukleotiden (AS-ODNs) als therapeutische Substanzen stellt neben verschiedenen anderen Anwendungsfeldern auch ein neues erfolgversprechendes Therapiekonzept für onkologische Erkrankungen dar. Während es bei der konventionellen
- 10 Chemotherapie zu einer unspezifischen Hemmung der Zellproliferation kommt, werden mit der Antisense-Therapie

ganz gezielt solche mRNAs inaktiviert, die die molekulare Grundlage oder ein wesentlicher Bestandteil für das entartete, deregulierte Wachstum und die Tumorprogression darstellen sowie für die Inhibierung der körpereigenen Immunabwehr verantwortlich sein können.

Antisense-Oligonukleotide (AS-ODN) unterscheiden sich von anderen Therapeutika, wie Antikörpern, Toxinen oder Immuntoxinen dahingehend, dass es sich um relativ kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von üblicherweise etwa 5 kDa handelt. Die geringe Größe der AS-ODN ermöglicht eine gute Gewebepenetration. Außerdem ist bekannt, dass Tumorblutgefäße im Gegensatz zu Blutgefäßen normaler Gewebe für Substanzen in einem Größenbereich zwischen 4-10 kDa durchlässig sind. Das bedeutet, dass therapeutische AS-ODN gezielt Tumorblutgefäße penetrieren können. Ein weiterer Vorteil dieser Substanzen, zum Beispiel gegenüber Antikörpern, die nahezu ausschließlich gegen extrazelluläre Proteine wirksam sind, besteht darin, dass über die jeweilige Target-mRNA prinzipiell alle, also sowohl zytoplasmatische als auch kernlokalisierte sowie membranständige Proteine angegriffen werden können.

Die gegen einen Nuklease-Angriff relativ resistente Phosphorothioat-AS-ODN werden gegenwärtig in einer Reihe von klinischen Studien (Phase I-III) hinsichtlich ihres Potentials als Anti-Krebs-Therapeutika evaluiert. Dabei werden überexprimierte Targets in Tumoren angegriffen.

---

Bei Verwendung der Phosphorothioat-Oligonukleotide (PS-ODNs) wurde eine Reihe von unerwarteten, so genannten



"non-AS"-Effekten beobachtet, die zudem zu einer unspezifischen Hemmung des Zellwachstums führten. Diese Effekte sind stark von der ODN-Sequenz bzw. von bestimmten Sequenzmotiven abhängig und treten auf Grund der starken polyanionischen Ladung der PS-ODN auf, welche eine Bindung der PS-ODN an lebenswichtige Proteine zur Folge haben kann. Die erwähnten negativen Effekte könnten durch Verwendung der so genannten zweiten Generation von AS-ODN ("mixed backbone" ODN) überwunden werden. Ein positiver Nebeneffekt, der bei Verwendung der PS-ODN beobachtet wurde, ist deren immunstimulatorische Wirkung, die bei einigen Tumoranwendungen durchaus einen möglichen Therapieerfolg unterstützen kann.

Ribozyme sind als katalytisch aktive RNA-Moleküle in der Lage, zelluläre RNA-Strukturen als Substrate zu erkennen und sequenzspezifisch an einer Phosphordiesterbindung zu spalten. Die Erkennung erfolgt über AS-Arme, die aufgrund komplementärer Sequenzen eine Hybridisierung mit der Ziel-mRNA ermöglichen. Gegenüber AS-ODN besitzen Ribozyme den grundsätzlichen Vorteil, dass ein Ribozym-Molekül als echter Katalysator eine große Anzahl identischer Substratmoleküle umsetzen kann. Daher sind Ribozyme bereits in wesentlich geringerer Konzentration als ODN wirksam und führen darüber hinaus durch die Substrat-Spaltung zu einem irreversiblen RNA-Abbau [Sun et. al.].

Unter den bisher bekannten Ribozymtypen ist das ~~Hammerhead-Ribozym~~ (Review: Birikh et al., 1997; Tanner, 1999) für derartige Anwendungen besonders interessant, weil es als vergleichsweise kleines Molekül (ca. 30-50

Nukleotide) bereits katalytisch aktiv sein kann. Ein sehr wirksames trans-spaltendes Hammerhead-Ribozym besteht zum Beispiel aus lediglich 14 konservierten Nukleotiden in der katalytischen Domäne und zwei variablen Stammsequenzen  
5 (vorteilhafterweise aus jeweils 6-8 Nukleotiden), die durch Watson-Crick-Basenpaarung (analog der Antisense-ODN) die sequenzspezifische Erkennung des zu spaltenden Substrates realisieren und dieses anschließend durch Spaltung einer Phosphordiester-Bindung inaktivieren. In dieser Form lässt  
10 sich praktisch gegen jedes beliebige RNA-Molekül, welches eine potentielle Spaltstelle mit der minimalen Sequenzanforderung besitzt, ein spezifisch spaltendes Hammerhead-Ribozym konstruieren und somit beispielsweise zelluläre mRNA oder virale RNA inhibieren.

15 RNAi ("RNA interference") ist eine neue Methodik, die eine spezifische Geninhibition von Target-Molekülen auf mRNA-Ebene ermöglicht. Hierfür müssen doppelsträngige RNA-Moleküle mit ihren zwei Nukleotiden langen  
20 3'-Überhängen, bestehend bevorzugt aus Thymidin-Nukleotiden ("small interference RNA", siRNA) in Zellen transfiziert werden. Zunächst erfolgt eine Assoziation der siRNA-Konstrukte mit spezifischen zellulären Proteinen, gefolgt durch die Erkennung der Target-mRNA-Sequenz aufgrund der  
25 Komplementarität des Antisense-si-RNA-Stranges. Die intrinsische Endonukleaseaktivität des Ribonukleoproteinkomplexes ermöglicht eine spezifische Degradation der zu inhibierenden mRNA.

---

30 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das Antisense-Oligonukleotid (AS-ODN) ein Phosphothioat-

Antisense-Oligonukleotid oder ein mixed-backbone Oligonukleotid (Review in Agrawal und Kandimalla 2000). Dabei handelt es sich sowohl um partiell modifizierte oder vollständig via dieser chemischen Modifikation geschützte ODN-Konstrukte. Ein endständige Modifizierung von ODN-Konstrukten (bevorzugt 2-5 Bindungen vom 3'- und 5'-Nukleinsäureterminus sind modifiziert) bietet insbesondere einen verbesserte Stabilität bei einer Applikation in vivo und im extra- und intrazellären Milieu der Zielzellen (Schutz insbesondere vor Exonuklease-Abbau).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Sequenzbereich der hTERT-mRNA, zu der das Erkennungsmolekül komplementär ist, ausgewählt aus der Gruppe umfassend 2183-2205, 2206-2225, 2315-2334, 2324-2346, 2317-2336, 2331-2350 und/oder 2333-2352.

Mit diesen Sequenzbereichen ist es vorteilhafterweise möglich, die Aktivität des Gens einer katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase zu inhibieren. Durch die Inhibition können unter anderem Krankheiten, die mit der Aktivität dieses Gens assoziiert sind, unterdrückt werden, wie zum Beispiel Tumoren.

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, gegebenenfalls in einer Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Dieser pharmazeutische Träger kann insbesondere zusätzliche Stoffe und Substanzen, wie beispielsweise medizinische und/oder pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe, umfassen.

Medizinische Hilfsstoffe sind beispielsweise solche Stoffe, die zur Produktion als Ingredienzien von pharmazeutischen Zusammensetzungen eingesetzt werden. Pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe dienen der geeigneten Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Arzneimittels und können sogar - sofern sie nur während des Herstellungsverfahrens benötigt werden - anschließend entfernt werden oder können als pharmazeutisch verträgliche Trägersubstanzen Teil der pharmazeutischen Zusammensetzung sein. Die pharmazeutische Zusammensetzung erfolgt gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel. Hierbei kann es sich beispielsweise um phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Wasser, Emulsionen, wie beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile Lösungen und ähnliches handeln. Die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung kann beispielsweise im Zusammenhang mit einer Gentherapie geschehen, beispielsweise auch über geeignete Vektoren, wie beispielsweise virale Vektoren oder/und eine Komplexierung mit Lipiden oder Dendrimeren. Die Art der Dosierung und des Verabreichungsweges kann vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen Anforderungen bestimmt werden. Es ist dem Fachmann bekannt, dass die Art der Dosierung von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie beispielsweise der Größe, der Körperoberfläche, dem Alter, dem Geschlecht oder dem allgemeinen und krankheitsspezifischen Gesundheitszustand des Patienten, aber auch von dem speziellen Mittel, welches verabreicht wird, der Dauer und Art der Verabreichung und von anderen Medikamenten, die

möglicherweise parallel, insbesondere in einer Kombinationstherapie, verabreicht werden.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit umfassend das  
5 Erkennungsmolekül und/oder die pharmazeutische  
Zusammensetzung. Weiterhin betrifft die Erfindung auch ein  
Array umfassend das Erkennungsmolekül und/oder die  
pharmazeutische Zusammensetzung. Der Kit und der Array  
können zur Diagnose und/oder Therapie von Krankheiten  
10 eingesetzt werden, die mit der Funktion der katalytischen  
Untereinheit der humanen Telomerase assoziiert sind. Die  
Erfindung betrifft auch die Verwendung des  
Erkennungsmoleküls, des Kits, des Arrays zur Diagnose,  
Prophylaxe, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle  
15 und/oder Nachbehandlung von mit Zellwachstum,  
-differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang  
stehenden Krankheiten.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die mit  
20 Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im  
Zusammenhang stehende Krankheit ein Tumor. Besonders  
bevorzugt ist der Tumor ein solider Tumor und/oder eine  
Leukämie.

25 Insbesondere kann es sich bei den Tumoren im Sinne der  
Erfindung um folgende Krebsarten handeln: Adenokarzinome  
der Brust, der Prostata und des Dickdarms; alle Formen von  
Lungenkrebs, der von den Bronchien ausgeht;  
~~Knochenmarkkrebs, das Melanom, das Hepatom, das~~  
30 Neuroblastom; das Papillom; das Apudom, das Choristom, das  
Branchiom; das maligne Karzinoid-Syndrom; die Karzinoid-

Herzerkrankung; das Karzinom (z.B. Walker-Karzinom, Basalzellen-Karzinom, basosquamöses Karzinom, Brown-Pearce-Karzinom, duktales Karzinom, Ehrlich-Tumor, in situ-Karzinom, Krebs-2-Karzinom, Merkel-Zellen-Karzinom, Schleimkrebs, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Haferzellen-Karzinom, papilläres Karzinom, szirrhöses Karzinom, bronchiolo-alveoläres Karzinom, Bronchiai-Karzinom, Plattenepithelkarzinom und Transitionalzell-Karzinom); histiocytische Funktionsstörung; Leukämie (z.B. in Zusammenhang mit B-Zellen-Leukämie, Gemischt-Zellen-Leukämie, Nullzellen-Leukämie, T-Zellen-Leukämie, chronische T-Zellen-Leukämie, HTLV-II-assoziierte Leukämie, akut lymphozytische Leukämie, chronisch-lymphozythische Leukämie, Mastzell-Leukämie und myeloische Leukämie); maligne Histiocytose, Hodgkin-Krankheit, non-Hodgkin-Lymphom, solitärer Plasmazelltumor, Reticuloendotheliose, Chondroblastom; Chondrom, Chondrosarkom; Fibrom; Fibrosarkom; Riesenzell-Tumore, Histiocytom; Lipom; Liposarkom; Leukosarkom, Mesotheliom; Myxom; Myxosarkom; Osteom; Osteosarkom; Ewing-Sarkom; Synoviom; Adenofibrom; Adenolymphom; Karzinosarkom, Chordom, Craniopharyngiom, Dysgerminom, Hamartom; Mesenchymom; Mesonephrom, Myosarkom, Ameloblastom, Cementom; Odontom; Teratom; Thymom, Chorioblastom; Adenokarzinom, Adenom; Cholangiom; Cholesteatom; Cylindrom; Cystadenocarcinom, Cystadenom; Granulosazelltumor; Gynadroblastom; Hidradenom; Inselzelltumor; Leydig-Zelltumor; Papillom; Sertoli-Zell-Tumor, Thekazelltumor, Leiomyom; Leiomyosarkom; Myoblastom; Myom; Myosarkom; Rhabdomyom; Rhabdomyosarkom; Ependynom; Ganglioneurom, Gliom; Medulloblastom, Meningiom; Neurilemmom; Neuroblastom; Neuroepitheliom, Neurofibrom,

Neurom, Paragangliom, nicht-chromaffines Paragangliom, Angiokeratom, angiolymphoide Hyperplasie mit Eosinophilie; sclerosierendes Angiom; Angiomatose; Glomangiom; Hemangioendotheliom; Hemangiom; Hemangiopericytom, 5 Hemangiosarkom; Lymphangiom, Lymphangiomyom, Lymphangiosarkom; Pinealom; Cystosarkom phyllodes; Hemangiosarkom; Lymphangiosarkom; Myxosarkom, Ovarialkarzinom; Sarkom (z.B. Ewing-Sarkom, experimentell, Kaposi-Sarkom und Mastzell-Sarkom); Neoplasmen (z.B. 10 Knochen-Neoplasmen, Brust-Neoplasmen, Neoplasmen des Verdauungssystems, colorektale Neoplasmen, Leber-Neoplasmen, Pankreas-Neoplasmen, Hirnanhang-Neoplasmen, Hoden-Neoplasmen, Orbita-Neoplasmen, Neoplasmen des Kopfes und Halses, des Zentralnervensystems, Neoplasmen des 15 Hörorgans, des Beckens, des Atmungstrakts und des Urogenitaltrakts); Neurofibromatose und zervikale Plattenepitheldysplasie.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die 20 Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt oder verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe: Tumoren des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs umfassend Tumoren der inneren Nase, der Nasennebenhöhlen, des Nasopharynx, der Lippen, der Mundhöhle, des Oropharynx, des Larynx, des Hypopharynx, 25 des Ohres, der Speicheldrüsen und Paragangliome, Tumoren der Lunge umfassend nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Tumoren des Mediastinums, Tumoren des Gastrointestinaltraktes umfassend Tumoren des Ösophagus, des Magens, des Pankreas, der Leber, der 30 Gallenblase und der Gallenwege, des Dünndarms, Kolon- und Rektumkarzinome und Analkarzinome, Urogenitaltumoren

umfassend Tumoren der Nieren, der Harnleiter, der Blase, der Prostata, der Harnröhre, des Penis und der Hoden, gynäkologische Tumoren umfassend Tumoren des Zervix, der Vagina, der Vulva, Korpuskarzinom, maligne

5 Trophoblastenerkrankung, Ovarialkarzinom, Tumoren des Eileiters (Tuba Fallopii), Tumoren der Bauchhöhle, Mammakarzinome, Tumoren endokriner Organe umfassend Tumoren der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Nebennierenrinde, endokrine Pankreastumoren,

10 Karzinoidtumoren und Karzinoidsyndrom, multiple endokrine Neoplasien, Knochen- und Weichteilsarkome, Mesotheliome, Hauttumoren, Melanome umfassend kutane und intraokulare Melanome, Tumoren des zentralen Nervensystems, Tumoren im Kindesalter umfassend Retinoblastom, Wilms Tumor,

15 Neurofibromatose, Neuroblastom, Ewing-Sarkom Tumorfamilie, Rhabdomyosarkom, Lymphome umfassend Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome; primäre Lymphome des zentralen Nervensystems, Morbus Hodgkin, Leukämien umfassend akute Leukämien, chronische myeloische und lymphatische

20 Leukämien, Plasmazell-Neoplasmen, myelodysplastische Syndrome, paraneoplastische Syndrome, Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritoneale Karzinomatose, Immunsuppression-bezogene Malignität umfassend AIDS-bezogene Malignitäten wie Kaposi-Sarkom,

25 AIDS-assoziierte Lymphome, AIDS-assoziierte Lymphome des zentralen Nervensystems, AIDS-assoziiierter Morbus Hodgkin und AIDS-assoziiierter anogenitale Tumoren, Transplantations-bezogene Malignitäten, metastasierte Tumoren umfassend Gehirnmastasen, Lungenmetastasen,

30 Lebermetastasen, Knochenmetastasen, pleurale und perikardiale Metastasen und maligne Aszites.



In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem soliden Tumor um einen Tumor des Urogenitaltraktes und/oder des Gastrointestinaltraktes.

5

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Tumor ein Kolonkarzinom, ein Magenkarzinom, ein Pankreaskarzinom, ein Dickdarmkrebs, ein Dünndarmkrebs, ein Ovarialkarzinom, ein Zervikalkarzinom, ein Lungenkrebs, ein Nierenzellkarzinom, ein Hirntumor, ein Kopf-Halstumor, ein Leberkarzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren/Karzinome ist.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist der solide Tumor ein Mamma-, Bronchial-, Kolorektal- und/oder Prostatakarzinom.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Tumor des Urogenitaltraktes ein Harnblasenkarzinom. Das Harnblasenkarzinom (BCa) stellt in der Bundesrepublik Deutschland die vierthäufigste Krebsform und siebthäufigste Krebstodesursache bei Männern dar. Die TUR-B als generelle Primärtherapie des BCa erlaubt eine organerhaltende Entfernung von oberflächlichen Tumoren. Trotz dieser histopathologisch definierten vollständigen Entfernung des Tumors ist mit 50-70 % der Patienten ein relativ hoher Anteil innerhalb von zwei Jahren von einem Rezidiv betroffen [Stein et. al.]. Ein Diagnose- sowie Therapieproblem stellt das synchrone oder metachrone multifokale Auftreten von Tumorherden dar, wodurch das Auftreten von Rezidiven entfernt von der resezierten

Primärtumorlokalisation bedingt sein kann [Sidransky et. al.]. Bei Auftreten eines Rezidivs oder bei primär als oberflächlich eingestuften Tumoren erfolgt in der Regel nach der TUR-B eine Langzeitprophylaxe mit einem Immun-  
5 (Bazillus Calmette-Guérin - BCG) oder Chemotherapeutikum (z. B. Mitomycin-C, Taxol, Gemcitabin/Cisplatin). Patienten mit muskelinvasiven BCa und mit entdifferenzierten, oberflächlichen Tumoren, die trotz dieser Therapie rezidivieren, werden in der Regel radikal zystektomiert  
10 bzw. unter Erhalt der Blase mittels Mono-/Polychemo-, Immun- oder Strahlentherapie bzw. Kombinationsverfahren dieser Methoden behandelt. Chemo-, Immun- oder Strahlenbehandlungen sind aufgrund ihrer relativ unspezifischen Wirkmechanismen von einer hohen  
15 therapieinduzierten Toxizität begleitet.

Aufgrund der gesundheitspolitischen Bedeutung des Harnblasenkarzinoms (insbesondere in den westlichen Industrieländern), dem Fehlen tumorspezifischer Marker  
20 sowie der bekannten tumorbiologischen und zellulären Heterogenität des Tumors gibt es eine intensive Suche auf dem klinischen Forschungsgebiet zum Harnblasenkarzinom, die insbesondere auf die Identifizierung neuer oder/und ergänzender Therapieoptionen zielen.

25

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden das Erkennungsmolekül, die pharmazeutische Zusammensetzung, der Kit und/oder der Array für eine Verlaufskontrolle  
verwendet, die im Wesentlichen eine Überwachung der  
30 Wirksamkeit einer Antitumorbehandlung darstellt. Weiterhin ist es bevorzugt, dass das Erkennungsmolekül in einer

Kombinationstherapie, insbesondere zur Behandlung von Tumoren, verwendet wird. Besonders bevorzugt ist hierbei, dass die Kombinationstherapie eine Chemotherapie, eine Zytostatikabehandlung und/oder eine Strahlentherapie umfasst. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Kombinationstherapie eine adjuvante biologisch-spezifizierte Therapieform. Ganz besonders bevorzugt ist hierbei, dass diese Therapieform eine Immuntherapie ist. Weiterhin ist besonders bevorzugt, dass die Kombinationstherapie eine Gentherapie und/oder eine Therapie mit einem Erkennungsmolekül desselben oder eines anderen Zielmoleküls umfasst. Dem Fachmann sind verschiedene Kombinationstherapien, insbesondere zur Behandlung von Tumoren, bekannt. Es kann zum Beispiel vorgesehen sein, dass innerhalb einer Kombinationstherapie eine Zytostatikabehandlung erfolgt oder beispielsweise eine Bestrahlung eines bestimmten Tumorareals, wobei diese Behandlung mit einer Gentherapie kombiniert wird, wobei das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül als Antikrebsmittel eingesetzt wird. Das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül kann jedoch auch in Kombination mit anderen Erkennungsmolekülen eingesetzt werden, die gegen dasselbe Zielmolekül gerichtet sind oder gegen eine andere Struktur. Demgemäß kann es ganz besonders bevorzugt sein, dass das Erkennungsmolekül zur Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika und/oder Strahlen verwendet wird. Weiterhin ist es bevorzugt, dass das Erkennungsmolekül zur Hemmung der Vitalität, der Proliferationsrate von Zellen und/oder zur Induktion von Apoptose und eines Zellzyklus-Arrests verwendet wird.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand eines Beispiels näher erläutert werden, ohne auf dieses Beispiel beschränkt zu sein.

## 5 Beispiel

Die gut transfizierbare humane Harnblasenkarzinom-Zelllinie EJ28 zeigte nach Transfektion insbesondere bei Verwendung von fünf spezifischen anti-hTERT-AS-Konstrukten (vgl. Tab. 2) eine unmittelbar einsetzende und kontinuierliche Reduktion ihrer Viabilität um mehr als 65 % gegenüber der Nonsense-Kontrolle. Dabei war die Beobachtung besonders auffällig, dass vier der wirksamsten Konstrukte gegen ein einzelnes mRNA-Sequenzmotiv gerichtet waren.

15

Bereits nach vier von fünf Behandlungen mit dem Konstrukt AStel2331-50 waren nahezu keine lebenden Zellen mehr nachweisbar. Die Behandlung telomerasenegativer humaner Fibroblasten führte hingegen zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen Antisense- und Nonse-ODN-behandelten Zellen, was eine Spezifität der AS-ODN-Wirkung auf die BCa-Zelllinie EJ28 indirekt belegt (Daten nicht gezeigt). Die AS-spezifische Wirksamkeit wurde anschließend detailliert untersucht: in Übereinstimmung mit dem Viabilitätstest konnte in Bezug auf das Proliferations- und Zellkoloniebildungsverhalten (Abb. 4) ein Hemmeffekt dieser fünf AS-ODN belegt werden. Zudem konnte die AS-spezifische Verringerung des Zellanteils in der DNA-Synthesephase (bis ca. 30 %) in Richtung einer G1-Arretierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Beweis für die AS-spezifische Wirkung der gegen die Zielmotive gerichteten

AS-ODN wurde in Form einer signifikanten und zeitabhängigen Reduktion der hTERT-Transkriptmenge erbracht (Abb. 3). In Übereinstimmung damit wurde auch die hTERT-Proteinexpression reprimiert. Außerdem wurde als Folge davon die Telomeraseaktivität der EJ28-Zellen um mehr als 60 % gehemmt (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die wirksamsten der AS-Konstrukte auf ein einziges Einzelstrangmotiv der hTERT-mRNA zurückzuführen sind.

Tab. 2 hTERT-AS- und NS-ODN: Nukleotid- und Target-Sequenzen

Bezeichnung <sup>1</sup>	ss-Motiv <sup>2</sup>	Sequenz <sup>3</sup> (5' → 3')
AS-ODN	Target	
ASel2206-2225	2191-2224	tgtcctgggggatggtgtcg
ASel2315-2334	2318-2346	ttgaaggccttgcgacgtg
ASel2317-2336		tcttgaaggccttgcgacg
ASel2331-2350		ggtagagacgtggctcttga
ASel2333-2352		aaggtagagacgtggctctt
NS-ODN		
NS-K2	-	cagtctcagtactgaagctg
NS-K3		cagcttcagtactgagactg

<sup>1</sup> Der Name beinhaltet den Sequenzbereich der hTERT-mRNA (Acc. No.: AF015950), zu der das jeweilige AS-ODN komplementär ist; <sup>2</sup> Die ss-Motive wurden in 5'- und 3'-Richtung um jeweils 10 nt erweitert; <sup>3</sup> Die fett gedruckten Nukleotide stellen den Bereich im AS-ODN dar, der komplementär zur ss-Region des Ziel-Motivs ist.

## Patentansprüche

- 5 1. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein Gen einer  
katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit  
der katalytischen Untereinheit der humanen  
Telomerase-mRNA im einem Target-Sequenzbereich von  
10 2000 bis 2500 gemäß der Accession number AF015950  
spezifisch interagiert.
2. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit  
15 dem Target-Sequenzbereich von 2100 bis 2400 spezifisch  
interagiert.
3. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit  
20 dem Target-Sequenzbereich von 2190 bis 2360 spezifisch  
interagiert.
4. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit  
25 dem Target-Sequenzbereich von 2191 bis 2224 und/oder  
von 2318 bis 2346 spezifisch interagiert.
5. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
~~dadurch gekennzeichnet, dass der Sequenzbereich~~  
30 und/oder das Erkennungsmolekül durch Addition,  
Amplifikation, Inversion, Missense-Mutation,

Nonsense-Mutation, Punktmutation, Deletion und/oder Substitution modifiziert ist.

- 5 6. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül immobilisiert ist.
- 10 7. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül ein Nukleinsäurekonstrukt, ein Chelator, ein Lektin und/oder ein Antikörper ist.
- 15 8. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt ein Antisense-Oligonukleotid, ein DNAzym, eine Peptid-Nukleinsäure, ein Ribozym und/oder eine siRNA ist.
- 20 9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Antisense-Oligonukleotid ein Phosphothioat-Antisense-Oligonukleotid ist.
- 25 10. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet, dass der Sequenzbereich der hTERT-mRNA, zu der das Erkennungsmolekül komplementär ist, ausgewählt aus der Gruppe umfassend 2183-2205, 2206-2225, 2315-2334, 2324-2346, 2317-2336, 2331-2350 und/oder 2333-2352.
- 30 11. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10,

gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

- 5 12. Kit umfassend ein Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und/oder eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11.
- 10 13. Array umfassend ein Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und/oder eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11.
- 15 14. Verwendung eines Erkennungsmoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 10, eines Kits nach Anspruch 12 und/oder eines Arrays nach Anspruch 13 zur Diagnose, Prophylaxe, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten.
- 20 15. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ein Tumor ist.
- 25 16. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein solider Tumor oder eine Leukämie ist.
- 30 17. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der solide Tumor ein Tumor des Urogenitaltraktes und/oder des Gastrointestinaltraktes ist.



18. Verwendung nach Anspruch 15,

dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein  
Kolonkarzinom, ein Magenkarzinom, ein  
Pankreaskarzinom, ein Dickdarmkrebs, ein  
5 Dünndarmkrebs, ein Ovarialkarzinom, ein  
Zervikalkarzinom, ein Lungenkrebs, ein  
Nierenzellkarzinom, ein Hirntumor, ein Kopf-Halstumor,  
ein Leberkarzinom und/oder eine Metastase dieser  
Tumoren ist.

10

19. Verwendung nach Anspruch 15,

dadurch gekennzeichnet, dass der solide Tumor ein  
Mamma-, Bronchial-, Kolorektal- und/oder  
Prostatakarzinom und/oder eine Metastase dieser  
15 Tumoren ist.

15

20. Verwendung nach Anspruch 17,

dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor des  
Urogenitaltraktes ein Harnblasenkarzinom und/oder eine  
20 Metastase dieser Tumoren ist.

20

21. Verwendung nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet, dass die Verlaufkontrolle eine  
Überwachung der Wirksamkeit einer Antitumorbehandlung  
25 ist.

25

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 21,

dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül in  
... einer Kombinationstherapie verwendet wird. ...

30

23. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie  
eine Chemotherapie, eine Zytostatikabehandlung  
und/oder eine Strahlentherapie umfasst.
- 5 24. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie  
eine adjuvante biologisch-spezifizierte Therapieform  
umfasst.
- 10 25. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Therapieform eine  
Immuntherapie ist.
- 15 26. Verwendung nach einem Ansprüche 22 bis 25,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie  
eine Gentherapie und/oder eine Therapie mit einem  
Erkennungsmolekül desselben oder eines anderen  
Zielmoleküls umfasst.
- 20 27. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 23 zur  
Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber  
Zytostatika und/oder Strahlen.
- 25 28. Verwendungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10  
zur Hemmung der Vitalität, der Proliferationsrate von  
Zellen zur Induktion von Apoptose und/oder eines  
Zellzyklus-Arrests.

5

### Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen  
10 Telomerase gerichtet sind sowie die Verwendung dieser Erkennungsmoleküle zur Diagnose, Prophylaxe, Verminderung, Verlaufskontrolle von mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten, wie beispielsweise Tumorerkrankungen.

15

20

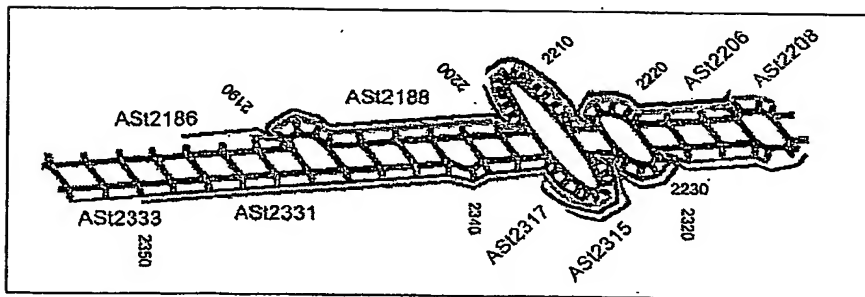


Abb. 1

AS-ODN gegen lokale Sekundärstrukturen der hTERT-mRNA

Dargestellt sind zwei gegenüberliegende ss-Strukturen (2201-14 und 2328-36 nt), gegen die jeweils vier AS-ODN gerichtet sind.

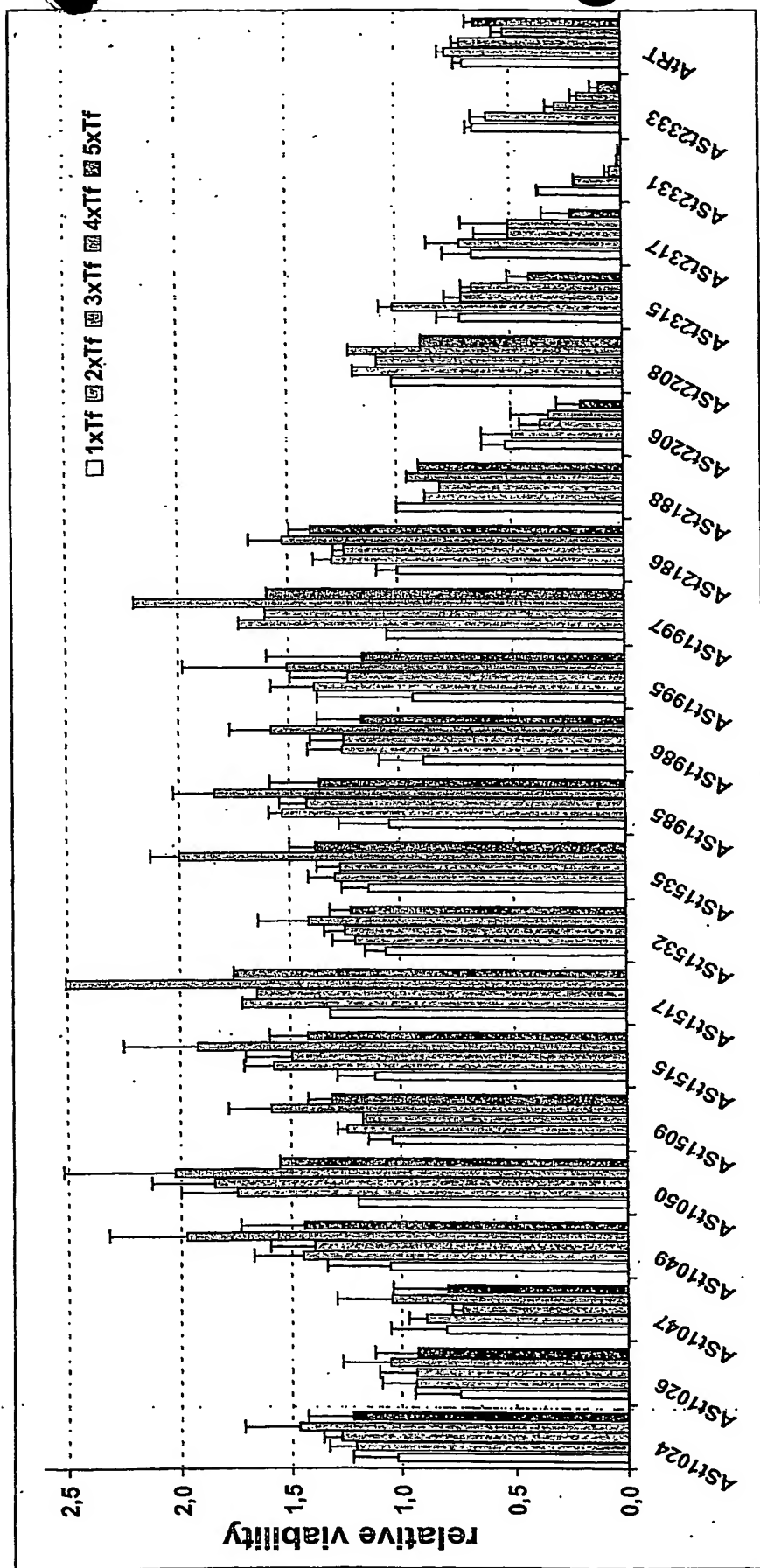


Abb. 2  
Einfluss von multiplen Anti-hTERT-Behandlungen mit verschiedenen AS-ODN auf die Viabilität von EJ28-Zellen

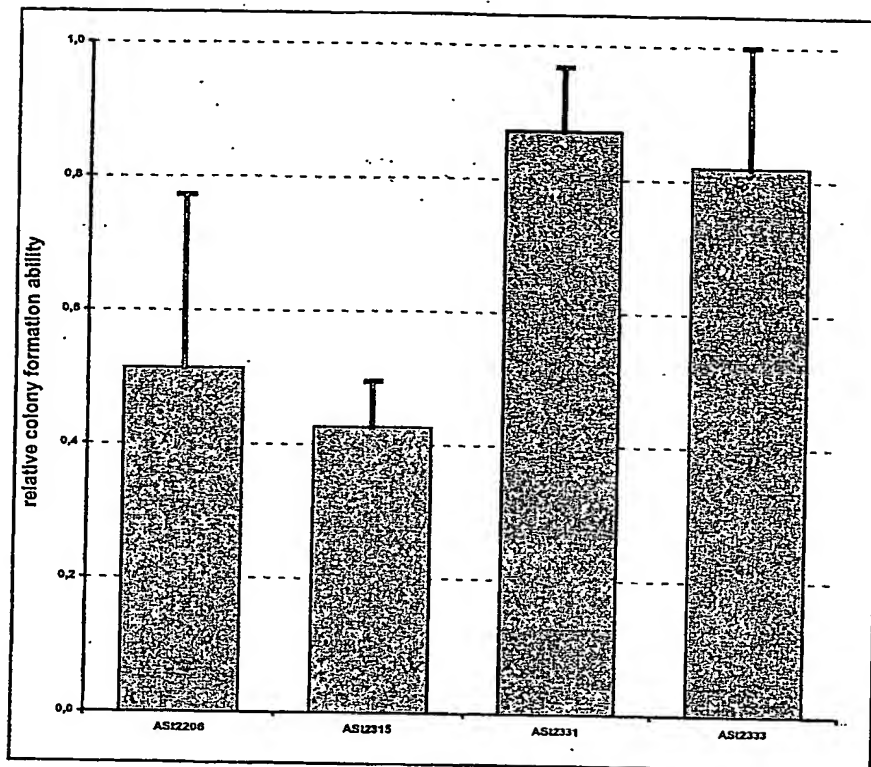


Abb. 3

Auswirkungen von zwei AS-ODN-Transfektionen auf das Koloniebildungsverhalten von EJ28-Zellen

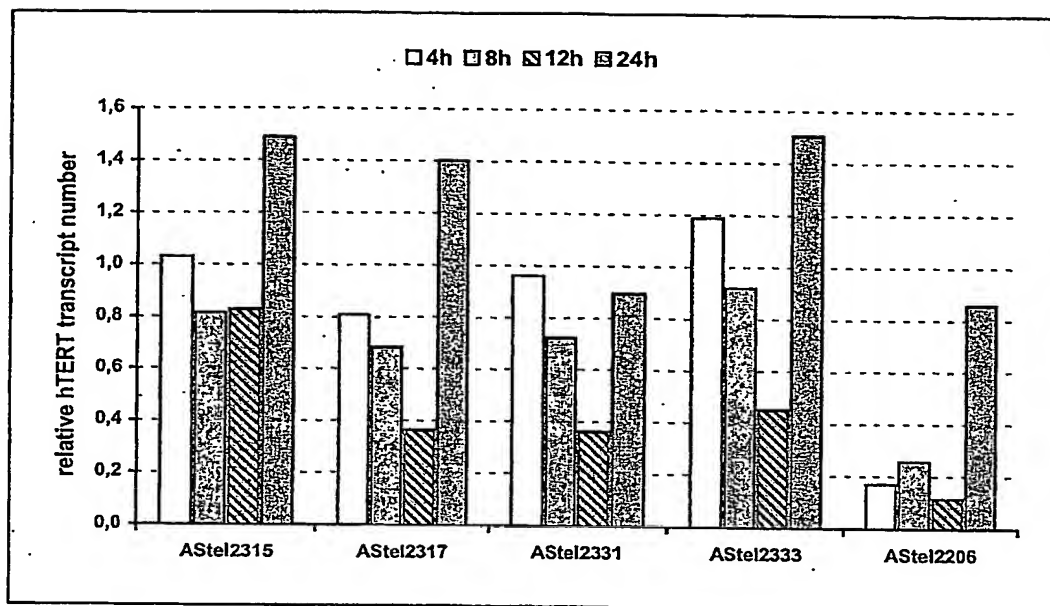


Abb. 4

Relatives Expressionsniveau AS-ODN behandelte EJ28-Zellen

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**